19 Rec'd 20 JUL 2004
PCT/JP03/00724

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

27.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application: ２００２年　１月２８日

出願番号
Application Number: 特願２００２－０１８６０６

[ST.10/C]: [ＪＰ２００２－０１８６０６]

出願人
Applicant(s): 日清ファルマ株式会社
株式会社ゲン・コーポレーション

REC'D 21 MAR 2003
WIPO PCT

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

２００３年　３月　４日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office 太田信一郎

BEST AVAILABLE COPY

出証番号　出証特２００３－３０１２５９６

【書類名】　特許願

【整理番号】　N11X2P

【あて先】　特許庁長官殿

【国際特許分類】　A61K 35/20

【発明者】

【住所又は居所】　埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡５丁目３番１号　日清ファルマ株式会社総合研究所内

【氏名】　平本　茂

【発明者】

【住所又は居所】　埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡５丁目３番１号　日清ファルマ株式会社総合研究所内

【氏名】　森下　由朗

【発明者】

【住所又は居所】　埼玉県入間郡大井町鶴ヶ岡５丁目３番１号　日清ファルマ株式会社総合研究所内

【氏名】　木村　修武

【発明者】

【住所又は居所】　岐阜県岐阜市佐野８３９番地の１　株式会社ゲン・コーポレーション免疫研究所内

【氏名】　児玉　義勝

【特許出願人】

【識別番号】　301049744

【住所又は居所】　東京都千代田区神田錦町一丁目２５番地

【氏名又は名称】　日清ファルマ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】　000129976

【住所又は居所】　岐阜県岐阜市折立２９６番地１

【氏名又は名称】　株式会社ゲン・コーポレーション

【代理人】

【識別番号】　100081352

【住所又は居所】　東京都中央区日本橋本町４丁目４番２号東山ビル　広瀬内外特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】　広瀬　章一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】　000365

【納付金額】　21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】　明細書　1

【物件名】　要約書　1

【包括委任状番号】　0115554

【包括委任状番号】　9206480

【プルーフの要否】　要

【書類名】　明細書

【発明の名称】　ヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項１】　糖と牛乳由来のタンパク質との褐変反応生成物を有効成分とするヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤。

【請求項２】　水溶液中で、糖と牛乳由来のタンパク質との褐変反応を起こさせる工程を含む、請求項１記載のヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤の製造方法。

【請求項３】　水溶液中で、糖と牛乳由来のタンパク質とを含む食品に褐変反応を起こさせる工程を含む、請求項１記載のヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤の製造方法。

【請求項４】　前記食品が脱脂粉乳である、請求項３記載の方法。

【請求項５】　前記食品が乳清である、請求項３記載の方法。

【請求項６】　褐変反応を、５％水溶液で測定して405nm の吸光度が0.01以上になるまで行う、請求項２ないし５のいずれかの項記載の方法。

【請求項７】　請求項１記載のヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤を含む、ヘリコバクター・ピロリが関与する疾患の予防または改善のための食品。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、消化性潰瘍等の発生に関与するヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）を胃内から排除しうるヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤、およびその製造方法、ならびにこの接着阻害剤を含む食品に関する。

【０００２】

【従来の技術】

ヘリコバクター・ピロリは、一端に数本の鞭毛(flagella)を持つ、螺旋型をしたグラム陰性桿菌で、ヒトの胃粘膜に生息する菌である。この菌は、1983年オーストラリアのMarshall,B.J. とWarren,J.Rによって胃炎、胃潰瘍患者の胃生検材料から高率に検出され、それ以降、疫学的研究から、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰

瘍の起因菌であり、さらには胃癌などの疾患と関連があるとの報告が相次いでなされている。

【０００３】

従って、現在、消化性潰瘍の根治的治療にはヘリコバクター・ピロリの除菌が不可欠であると考えられており、その除菌療法として以下に説明するように抗生物質と胃酸分泌抑制剤との併用療法が広く提唱されている。

【０００４】

ヘリコバクター・ピロリが一旦胃粘膜に定着すると、感染に対する免疫応答が強い（抗体価が高い）にもかかわらず、除菌されず胃内に生息し続ける。そのため、抗生物質による治療によって完全に除菌できない限り、投薬を中止すると約１ヶ月以内に治療前の感染状態に戻ってしまう。しかも胃内は酸度の高い塩酸によってpHが非常に低く保たれているので、多くの抗生物質は不活化される。このような理由で、ヘリコバクター・ピロリの除菌には、胃酸分泌を強力に抑制するプロトンポンプインヒビターと除菌薬（抗生物質）が併用の形で使用されている。また、現状ではヘリコバクター・ピロリの除菌には次サリチル酸ビスマス(bismuth subsalicylate)、メトロニダゾールおよびテトラサイクリンの新３剤併用療法が最も高い除菌率を示すことが分かっているが、抗生物質の長期間投与は、その副作用に加え、耐性菌の増加という非常に重大な問題が危惧される。

【０００５】

除菌を目的とした抗生物質の投与による副作用および耐性菌の増加などの問題を解決する方法として、現在、経口ワクチンによる免疫療法のアプローチが見られるが、実験の際の複雑な条件が障害となって、新しい予防、治療法の確立を目指した研究はほとんど進展していない。また、ワクチンはあくまで予防を主体とするものであり、一旦ヘリコバクター・ピロリが感染した患者に対しては効果は望めない。

【０００６】

【発明が解決しようとする課題】

上述のように、ヘリコバクター・ピロリを除菌するために抗生物質を長期にわたり使用すると、副作用と共に耐性菌の増加の恐れがある等種々の問題があった

。本発明の目的は、消化性潰瘍の発生に関与するヘリコバクター・ピロリの胃粘膜への接着を効果的に阻害でき、しかも従来の抗生物質の使用に伴う副作用や耐性菌増加等の欠点をもたない安全性の高いヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤を提供することである。

【０００７】

【課題を解決するための手段】

一般に細菌の感染が成立するためには細菌が宿主細胞に接着し、そこで増殖することによって定着することが感染の第一歩となる。細菌の宿主細胞への接着には、接着因子(adhesin) の宿主細胞表面の受容体(receptor)への結合が必要である。本発明者等は、ヘリコバクター・ピロリの接着機構に関する研究を通して、それまで解明されていなかった接着因子が、この菌が産生するウレアーゼであることを明らかにし、このウレアーゼに対する鶏卵黄抗体をヘリコバクター・ピロリ定着マウスに経口投与したところ、ヘリコバクター・ピロリの胃内増殖を顕著に抑制することを示した（特開平10－287585号）。

【０００８】

そこで、本発明者等は、ウレアーゼの胃粘膜への付着を阻止しうる物質を種々検討した結果、糖と牛乳由来タンパク質との褐変反応生成物が、接着因子であるウレアーゼの胃粘膜への接着を効果的に阻止しうることを見出し、本発明を完成させた。

【０００９】

すなわち、本発明は、糖と牛乳由来のタンパク質との褐変反応生成物を有効成分とするヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤である。

また、本発明は、水溶液中で、糖と牛乳由来のタンパク質との褐変反応を起こさせる工程を含む、上記ヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤の製造方法に関する。さらに、本発明は、水溶液中で、糖と牛乳由来のタンパク質とを含む食品、特に好ましくは脱脂粉乳または乳清、に褐変反応を起こさせる工程を含む、上記ヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤の製造方法も提供する。

【００１０】

上記製造方法においては、褐変反応を、５％水溶液で測定して405nm の吸光度

が0.01以上になるまで行うのが好ましい。

さらに、本発明は、上記ヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤を含む、ヘリコバクター・ピロリが関与する疾患の予防または改善のための食品も提供する。

【００１１】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明を詳細に説明する。

本発明のヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤の有効成分は、糖と牛乳由来タンパク質の褐変反応生成物、すなわちアミノーカルボニル反応の生成物である。褐変反応は、各種糖と、各種牛乳由来タンパク質とを混合して水溶液中で加熱処理することにより行わせることができるが、糖およびタンパク質の両方を含有する、脱脂粉乳や乳清などの食品をそのまま水溶液中で処理することにより褐変反応を起こさせてもよい。

【００１２】

本発明における牛乳由来タンパク質は、牛乳に含まれるタンパク質であればいずれでもよく、例えば、カゼイン、β－ラクトグロブリン、α－ ラクトアルブミン、牛血清アルブミン、免疫グロブリン、ラクトフェリンなどが挙げられる。これらのタンパク質は、生乳より常法に従い精製したものを使用してもよいし、また市販のものをそのまま用いることもできる。これらの牛乳由来タンパク質は単独でも、また２種以上を組合せて使用してもよい。あるいは、脱脂粉乳や乳清などの牛乳由来のタンパク質混合物をそのまま用いてもよい。

【００１３】

脱脂粉乳は、生乳より脂肪分を分離除去した脱脂乳を粉末状に乾燥したものであり、カゼインを主体とする各種牛乳タンパク質、および乳糖などの糖を含有している。生乳より遠心分離により脂肪分を分離除去した脱脂乳を粉末化して得ることができるが、市販されている脱脂粉乳を使用してもよい。

【００１４】

乳清は、脱脂乳よりカゼインを除去したものであり、乳糖などの糖、およびβ－ ラクトグロブリン、α－ ラクトアルブミン、血清アルブミン、免疫グロブリン、ラクトフェリンなどの乳清タンパク質を含有している。本発明において使用す

る乳清としては、牛乳汁から乳脂肪およびカゼインを除去する通常の手段により調製してもよいし、市販の乳清濃縮物（粉末、微粒子）をそのまま使用してもよい。

【００１５】

褐変反応生成物の製造に使用する糖としては、D-グルコース、D-フラクトース、D-マンノース、D-ガラクトース、D-キシロース、L-アラビノース、D-リボース、乳糖などの種々の還元糖が挙げられる。これらの糖は精製品を用いてもよいが、脱脂粉乳や乳清などの還元糖含有食品をそのまま、糖として使用してもよい。脱脂粉乳や乳清などを用いる場合には、上述のように、タンパク質も含有しているので、牛乳由来タンパク質を別途混合することなく、褐変反応を行えばよい。

【００１６】

糖と牛乳由来のタンパク質との混合割合は任意の割合でよいが、糖をタンパク質の1/9 から等量の範囲にするのが好ましい。脱脂粉乳や乳清などのタンパク質と糖の両方を含む食品は、そのまま反応に使用できる。

【００１７】

褐変反応は水溶液中で行い、特に中性水溶液またはアルカリ水溶液中で行うのが好ましい。アルカリ水溶液としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウムなどの種々のアルカリの水溶液が使用でき、添加するアルカリの濃度も限定されない。例えば、0.05～0.5 規定の水酸化ナトリウムを用いることができる。水溶液の量は、糖とタンパク質の混合物、または糖とタンパク質を含む食品を十分に均一に懸濁できる量であればよく、10～20倍量とするのが望ましい。

【００１８】

褐変反応は、水溶液中で、405nm の吸光度（５％水溶液100 μｌをミクロプレートリーダーで測定）が0.01、特に0.1 以上になるまで行うのが好ましい。この吸光度が0.01以上であることは褐変反応が進行していることを意味する。

【００１９】

褐変反応の条件としては、中性水溶液中で行う場合、反応温度は100 ℃以上、特に120 ℃以上が好ましく、反応時間は通常20分間以上である。また、アルカリ

水溶液中で褐変反応を行う場合は、反応温度は室温から80℃、特に40～60℃が好ましく、反応時間は通常１時間～８時間、特に好ましくは４～６時間である。

【００２０】

得られる褐変反応生成物は、反応を中性水溶液中で行った場合には、そのまま凍結乾燥または噴霧乾燥などの手段により粉末化してもよい。または限外濾過などの手段により、未反応の糖を除去した後、凍結乾燥または噴霧乾燥などにより粉末化してもよい。反応をアルカリ水溶液中で行った場合には、褐変反応生成物は、塩酸などの酸性溶液を添加して中和後、凍結乾燥または噴霧乾燥などにより粉末化してもよく、または限外濾過やイオン交換樹脂などを用いて脱塩し、次いで凍結乾燥または噴霧乾燥などにより粉末化してもよい。

【００２１】

このようにして得られる、糖と牛乳由来タンパク質との褐変反応生成物は、以下の実施例で実証されるように、強いヘリコバクター・ピロリ接着阻害活性を有する。

【００２２】

従って、上記方法で得られる糖と牛乳由来タンパク質との褐変反応生成物は、効果的なヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤として使用でき、消化性潰瘍等のヘリコバクター・ピロリが関与する疾患の予防、改善に有用である。

【００２３】

本発明で使用する糖および牛乳由来タンパク質は、全て食品由来であり、また、褐変反応も食品の加熱調理の過程で常に起こっている反応であるので安全であると考えられる。よって、本発明の褐変反応生成物は、安全性が高く効果的なヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤として、医薬や食品に配合して利用することができる。特に、食品に配合し、抗ヘリコバクター・ピロリ作用を有する特定保健用食品、高齢者用食品や病者用食品等の特別用途食品、あるいは抗ヘリコバクター・ピロリ作用を有する栄養調整食品や健康食品としての利用に有用である。

【００２４】

本発明の褐変反応生成物からなる接着阻害剤は、褐変反応生成物をそのまま、あるいは適宜担体や賦型剤と共に、通常の任意の製剤化方法により製造できる。

必要に応じて、その他の添加剤や薬剤、例えば制酸剤（炭酸水素ナトリウム、炭酸マグネシウム、沈降炭酸カルシウム、合成ヒドロタルサイト等）、胃粘膜保護剤（合成ケイ酸アルミニウム、スクラルファート、銅クロロフィリンナトリウム等）や消化酵素（ビオジアスターゼ、リパーゼ等）を加えてもよい。本発明接着阻害剤の投与は経口により行い、投与量は成人１日当たり褐変反応生成物として通常0.01～10.0ｇ（乾物量）、好ましくは1.0 ～2.0 ｇである。

【００２５】

また、本発明の褐変反応生成物からなる接着阻害剤は、胃酸分泌抑制剤を併用することにより一層その効果を高めることができる。使用できる胃酸分泌抑制剤としては、ファモチジン、ニザチジン、ロキサチジン、ラニチジン、シメチジン等のH_2 インヒビターや、オメプラゾール、ランソプラゾール、ラベプラゾールナトリウム等のプロトンポンプインヒビターがある。胃酸分泌抑制剤の投与量は成人１日当たり20～30mgが好ましい。

【００２６】

褐変反応生成物を食品へ添加して特定保健用食品や特別用途食品として利用する場合、食品へ通常0.5 ～5.0 重量％程度、好ましくは1.0 ～3.0 重量％添加する。特定保健用食品としては、食品の種類は限定されないが、菓子類、粉末スープ類、飲料等継続して摂取できるものが好ましい。病者用食品（低ナトリウム食品、低カロリー食品、低タンパク質食品等）としては、スープ、飲料、流動食等の食品に褐変反応生成物を添加して各種形態の医療用食品とすることができる。

【００２７】

栄養調整食品としては、一例として褐変反応生成物にデキストリン等の賦型剤、カゼインナトリウムなどの粘着剤、必要に応じ、ビタミン類、ミネラル類等の栄養剤、乳化剤、安定剤、香料等を添加し、流動食の形態としうる。

【００２８】

褐変反応生成物を健康食品として利用する場合は、褐変反応生成物を有効成分として30～60重量％程度含有させ、これに乳糖、トウモロコシデンプン、結晶セルロース、PVP 等の賦形剤や結合剤を配合し、必要に応じビタミン類やミネラル等の栄養剤を添加して、細粒、錠剤、顆粒剤等の各種形態に成形して利用するこ

とができる。

【００２９】

以下に、本発明を詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はそれらによって限定されるものではない。

【００３０】

【実施例】

【００３１】

【実施例１】

カゼインと乳糖のアルカリ水溶液での褐変反応

0.2 規定水酸化ナトリウム水溶液10mlの入った50ml容スピッツ管に、乳糖 100mgとカゼイン900mg を添加し、試験管ミキサーで均一な懸濁液となるまで振盪した。50℃の水浴で４時間加温し、褐変反応を行った。0.2 規定塩酸を反応液のpHが7.0 になるまで添加した。凍結乾燥を行い、褐色の粉末を得た。

【００３２】

乳糖とカゼインの添加割合を以下のように変え、同一の条件で褐変反応、中和および凍結乾燥を行い、生成物1-1 ～1-4 を凍結乾燥粉末として得た。

乳糖	カゼイン	生成物
100mg	900mg	1-1
300mg	700mg	1-2
400mg	600mg	1-3
500mg	500mg	1-4

【００３３】

【実施例２】

カゼインナトリウムと乳糖の水溶液での褐変反応

蒸留水10mlの入った50ml容スピッツ管に、乳糖 400mgとカゼインナトリウム600mg を添加し、試験管ミキサーで振盪し、溶解した。高温滅菌器で、120 ℃、20分間褐変反応を行った。反応溶液は凍結乾燥を行い、褐色の粉末を得た（生成物２）。

【００３４】

【実施例３】

β－ ラクトグロブリンと乳糖の褐変反応

0.2 規定水酸化ナトリウム水溶液1.0ml の入った15ml容スピッツ管に、乳糖40mgとβ－ ラクトグロブリン60mgを添加し、試験管ミキサーで振盪し、溶解した。50℃の水浴で４時間加温し、褐変反応を行った。0.2 規定塩酸を反応液のpHが7.0 になるまで添加した。Sephadex G-25 (Amersham-Pharmacia)を用いたゲル濾過により脱塩を行った後、凍結乾燥を行い、褐色の粉末を得た（生成物３）。

【００３５】

【実施例４】

α－ ラクトアルブミンと乳糖の褐変反応

0.2 規定水酸化ナトリウム水溶液1.0ml の入った15ml容スピッツ管に、乳糖40mgとα－ ラクトアルブミン60mgを添加し、試験管ミキサーで振盪し、溶解した。50℃の水浴で４時間加温し、褐変反応を行った。0.2 規定塩酸を反応液のpHが7.0 になるまで添加した。Sephadex G-25 (Amersham-Pharmacia)を用いたゲル濾過により脱塩を行った後、凍結乾燥を行い、褐色の粉末を得た（生成物４）。

【００３６】

【実施例５】

脱脂粉乳の褐変反応

脱脂粉乳（E-22、協同乳業社製）1.0gを0.2 N-NaOH 10ml に添加した。攪拌により均一な懸濁液とした後、50℃の水浴で４時間放置し、褐変反応を行った。0.2 N-NaOHを溶液のpHが7.0 になるまで滴下した。凍結乾燥を行い、褐色の粉末を得た（生成物５）。

【００３７】

【実施例６】

乳清の褐変反応

乳清（SIMPLESSE 100 、CPKelco 社製）1.0gを0.2 N-NaOH 10ml に添加した。攪拌により均一な懸濁液とした後、50℃の水浴で４時間放置し、褐変反応を行った。0.2 N-NaOHを、溶液のpHが7.0 になるまで滴下した。凍結乾燥を行い、褐色

の粉末を得た（生成物６）。

【００３８】

【実施例７】

カゼインナトリウムとブドウ糖の水溶液での褐変反応

蒸留水100ml に、ブドウ糖４ｇとカゼインナトリウム６ｇを添加し、固形物が溶解するまで攪拌した。高圧滅菌器で、110 ℃、30分間褐変反応を行った。Sephadex G-25 (Amersham-Pharmacia 社製) を用いたゲル濾過により、低分子区分を除去した後、凍結乾燥を行い、褐色の粉末を得た。

【００３９】

反応条件のみを以下のように変えて反応を行った後、Sephadex G-25 を用いたゲル濾過により、低分子区分を除去し、凍結乾燥を行い、褐色の粉末を得た。

反応温度	反応時間	生成物
110 ℃	30分間	7-1
120 ℃	10分間	7-2
120 ℃	40分間	7-3

【００４０】

【実施例８】

褐変反応の進行の測定

褐変反応の進行を405nm における吸光度で測定した。

【００４１】

実施例１～７で作製した褐変反応生成物50mgを蒸留水１mlに溶解した。10,000ｇで15分間遠心分離を行い、遠心上清の100 μｌを96穴プレート (NUNC immunoplate、注文番号442404) に注入した。ミクロプレートリーダー (Molecular Device社Versa Max)で650nm の吸光度を対照波長とした際の405nm の吸光度を測定した。下記表１に示すように、実施例の全ての生成物が0.1 以上の吸光度を示した。よって、実施例の全ての反応において、褐変反応が進行したことが確認された。

【００４２】

【実施例９】ヘリコバクター・ピロリ接着阻害活性の測定

実施例１～７で作製した褐変反応生成物について、ピロリ菌の接着因子であるウレアーゼの胃粘膜への接着阻害効果を、以下のようにしてインビトロ実験系において調べた。

【００４３】

(実験材料および方法)

本発明者等は、先に、ピロリ菌の接着因子がこの菌が産生するウレアーゼであることを見出している。このウレアーゼが胃粘膜ムチンと特異的に結合することによって、ピロリ菌が宿主の胃に接着し、定着する。従って、このピロリ菌のウレアーゼと胃ムチンとの接着を、より低濃度で阻害するものが、より強いヘリコバクター・ピロリ接着阻害活性を持つものである。

【００４４】

接着阻害試験に用いるウレアーゼおよびブタ胃ムチンの調製は以下のように行った。

ウレアーゼの調製

ヘリコバクター・ピロリ#130株（東海大学医学部感染症学部より入手）のブルセラブローズ培養菌液（3.5 $\times 10^8$ CFU/ml）を12,000×ｇで20分間遠心した後、ペレットを精製水に溶解し、ボルテックスミキサーで60秒間処理した。再び遠心し、ウレアーゼを含む抽出上清液を得た。精製は以下に示した方法によって行った。

【００４５】

緩衝液（20mMリン酸塩、pH6.8，1mM EDTA，1 mM 2- メルカプトエタノールおよび10%PEG300）で平衡化したDEAE－セファセルカラムに上記抽出液をアプライし、0.5ml/分の流速でゲルに吸着させた。溶出は０～0.5M KClの濃度勾配によって実施した。各分画液についてウレアーゼ活性をモニターした。ウレアーゼ活性のピークが認められた分画をプールし、濃縮した。次に、緩衝液（20mMリン酸塩、pH6.8，150mM NaCl)で平衡化したセファクリルS-300 カラムに、上記濃縮液をアプライし、溶出した。各分画液のウレアーゼ活性を測定し、ウレアーゼ活性のピークを各々プールし、SDS-PAGEで分析したところ、ウレアーゼＡ(32kDa) とウレアーゼＢ(60kDa) のタンパク質からなることを確認した。ウレアーゼは使用する

まで小分けし、-80 ℃で保存した。

ブタ胃ムチンの調製

約２ヶ月齢の健康な豚を屠殺し、胃部を摘出し、内部に0.1Mリン酸塩＋0.15M NaCl＋5mM N-エチルマレイミド(NEM) ＋1mM フェニルメチルスルホニルフルオライド(PMSF)＋1mM EDTA含有PBS(pH7.4)を加えて洗浄した。胃を切開し、粘膜を削り取り、上記の緩衝液に浮遊させた。この粘膜浮遊液を氷冷しながらポリトロンホモゲナイザーを用いて均一にした。これを15,000×ｇで遠心し上清を得た。この上清を25,000×ｇで再び遠心し、上清を回収し、蒸留水で透析した後、凍結乾燥して粗精製胃ムチンを得た。次いで、この乾燥粗精製胃ムチンをPBS(pH6.8)（6M塩酸グアニジンおよびプロティアーゼインヒビター(5mM NEM,1mM PMSF,1mM EDTA) を含む）に溶解し、これを塩化セシウム密度勾配(1.5g/ml) に重層し、34,000×ｇで48時間遠心した。シアル酸含有分画の検出はニトロセルローズ膜ブロッティングと過ヨウ素酸シフ試薬による染色によって行った。発色した分画をプールし、再び塩化セシウム密度勾配に重層して遠心した。染色陽性分画をプールし、凍結乾燥した。次いで、0.1Mリン酸緩衝液(0.1M NaCl含有、pH6.8)で平衡化したセファロースCL-4B カラムを通してゲル濾過を行い、分画した。PAS 染色陽性で、蛋白濃度の高い分画をプールし、PBS(pH6.8)で透析し、精製ブタ胃ムチンを得た。これを使用時まで－80℃に保存した（精製ブタ胃ムチン）。なお、精製ブタ胃ムチンはSDS-PAGEの結果、66kDの糖タンパク質であることを認めた。

【００４６】

ブタ精製胃ムチンは、常法に従いビオチン化し、アッセイに使用した。

ピロリ菌ウレアーゼ接着阻害試験

96ウエルマイクロプレートの各々のウェルに、あらかじめ、5 μg/mlの濃度に調製したピロリ菌ウレアーゼの0.05M 炭酸ナトリウム緩衝溶液を50μl ずつ加え、4 ℃で一晩静置し、ウェルにウレアーゼを吸着させた。各ウェルをツイーン２０を0.05% 含有するリン酸緩衝生理食塩水（pH7.0 ）150 μl で3 回洗浄後、3% 牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水（pH7.0 ）150 μl を加えた。37 ℃、1 時間静置することにより、ブロッキングを行った。溶液を除去後、ツイーン20を0.05% 含有するリン酸緩衝生理食塩水（pH7.0 ）150 μl で3 回洗浄を行

った。

【００４７】

2.5 μg/mlのビオチン化ブタ胃ムチンと試験サンプルの一定濃度を含む0.05%ツイーン２０ 含有リン酸緩衝生理食塩水(pH4.0) 50μl をそれぞれのウェルに加え、37℃で1 時間静置し、ウレアーゼにビオチン化ブタ胃ムチンを接着させた。ウェルから溶液を除去し、0.05%ツイーン20含有リン酸緩衝生理食塩水(pH4.0) 150 μl で、3 回洗浄後、65℃で、10分間静置し、タンパク質を固定した。0.05%ツイーン20含有リン酸緩衝生理食塩水(pH7.0) 150 μl で3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンの0.05%ツイーン20含有リン酸緩衝生理食塩水(pH7.0) 50μl を加え、室温で1 時間静置した。0.05%ツイーン20含有リン酸緩衝生理食塩水(pH7.0) 150 μl で5 回洗浄後、オルトーフェニレンジアミン２塩酸およびH_2O_2を含む基質溶液(pH4.5) 50μl を各ウェルに加え、ペルオキシダーゼ反応を行った。室温で5 分間反応後、２N 硫酸 50 μl を添加し、酵素反応を停止させた。次いで、各ウェルの490nm の吸光度を測定した。接着阻害活性は、以下の計算式により算出した。

接着阻害活性（%）

＝[1-(サンプル添加ウェルの吸光度／サンプル無添加ウェルの吸光度)]×100

結果

下記表１に、実施例１～７で得られた褐変反応生成物の、100 μg/ml の濃度における接着阻害活性を示す。すべての生成物が、ピロリ菌のウレアーゼとブタ胃ムチンの結合を強く阻害することが明らかになった。

【００４８】

【表1】

表．牛乳由来タンパクと糖との褐変反応生成物の結合阻害活性

生成物番号	吸光度（405nm、対照波長 650nm）	結合阻害活性（%）
1－1	0.363	70
1－2	0.956	78
1－3	1.017	84
1－4	1.030	81
2	0.128	60
3	1.761	72
4	1.911	66
5	1.431	82
6	1.302	69
7－1	0.164	50
7－2	0.582	52
7－3	1.219	43

【0049】

【発明の効果】

上述のように、本発明によれば、安全で優れたヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤が提供される。この阻害剤は、ヘリコバクター・ピロリによって引き起こされる消化性潰瘍等を、副作用を生じることなく効果的に抑制することが可能である。また、従来消化性潰瘍の治療に用いられてきた抗生物質とは異なり、耐性菌

の問題も生じず、胃内のヘリコバクター・ピロリを特異的に除菌することができる。

【書類名】　　要約書

【要約】

【課題】　安全で効果的なヘリコバクター・ピロリの接着阻害剤を提供する。

【解決手段】　糖と牛乳由来タンパク質との褐変反応生成物を有効成分とするヘリコバクター・ピロリ接着阻害剤。この阻害剤は、医薬や食品、特に消化性潰瘍等の改善または予防のための食品として利用できる。

出証特２００３－３０１２５９６

認定・付加情報

特許出願の番号	特願２００２－０１８６０６
受付番号	５０２００１０７９４５
書類名	特許願
担当官	第五担当上席　　００９４
作成日	平成１４年　１月２９日

＜認定情報・付加情報＞

【提出日】　平成14年 1月28日

次頁無

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　〔３０１０４９７４４〕

１．変更年月日　　２００１年　７月１８日
　［変更理由］　新規登録
　　住　所　　東京都千代田区神田錦町一丁目２５番地
　　氏　名　　日清ファルマ株式会社

出願人履歴情報

識別番号　〔０００１２９９７６〕

１．変更年月日　１９９０年　８月　６日
［変更理由］　新規登録
住　所　岐阜県岐阜市折立２９６番地１
氏　名　株式会社ゲン・コーポレーション